

Minna-Maaria Keinänen

Näytteenottotekniikan vaikutus NH_4 -näytteen pitoisuuteen spiroergometria laktaattinäyttein, tutkimuksessa

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Bioanalyttikko (AMK.)
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Opinnäytetyö
18.4.2012

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Minna-Maaria Keinänen Näytteenottotekniikan vaikutus NH_4 -näytteen pitoisuuteen spiroergometria laktaattinäyttein, tutkimuksessa 31 sivua + 2 liitettä 18.04.2012
Tutkinto	Bioanalyttikko Amk.
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaajat	Lehtori Hilkka Tukkiniemi Sairaanhoitaja Helena Honkala Ylilääkäri Päivi Piirilä ja kemisti Annukka Mäki

Työ tehtiin Meilahden klinisen fysiologian laboratorion tilauksesta. Työn tarkoituksena oli selvittää vaikuttaako näytetekniikan valinta ammonium-ioni(NH_4)-näytteen pitoisuuteen spiroergometria tutkimuksessa, laktaattinäyttein. NH_4 -ioni on herkästi haihtuva ja tulee siksi tutkia 60 minuutin sisällä näytteenotosta. Suosituksen mukaan NH_4 -näyte tulee ottaa vakuumitekniikalla, suljettuun vakuuminäyteputkeen, jotta minimoidaan mahdollinen haihtuminen huoneilmaan. Ongelmatilanteissa tämä ei aina onnistu, joten näissä tilanteissa näyte on otettava avonäytteenä näyteputkeen. Työn tavoitteena oli selvittää, vaikuttaako näytteenottotekniikka NH_4 -Ion pitoisuuksiin. Suoritin työssäni aikaseurannan tarkastellakseni NH_4 -näytteelle asetettua aikarajoitusta.

Tutkimusaineistona käytettiin 45 näyteparia NH_4 -näytteitä, jotka oli kerätty viideltä spiroergometria laktaattinäyttein - tutkimuksen potilaalta. Näyteparit koostuivat avo- ja vakuuminäytteistä, jotka käsiteltiin samalla tavalla tutkimusprosessin jokaisessa vaiheessa ja analysoidiin Cobas Integra 400 plus analysaattorilla. Aikaseuranta suoritettiin laboratorioprosessin neljässä eri vaiheessa, joista jokaisessa kerättiin minuutintarkka aika kaavakkeelle. Analyysin tulosteet käsiteltiin excel- ja NCSS-tilastonkäsittelyohjelmalla. Tuloksista laskettiin parivertailuasetelmalla tilastolliset merkittävyyserot ja kaksisuuntaisella varianssianalyysillä yhdysvaikutusta tekniikan ja ajanhetken välillä virheiden poissulkemiseksi. Aikaseurannan tuloksinassa käytettiin excel-ohjelmaa, jolla laskettiin analyysiprosessin viiveaikoja.

Tulokset osoittavat, että tilastollisesti merkittävää eroa ei synny näytetekniikoiden välille neljässä tapauksessa viidestä. Yhdysvaikutus testissä kävi ilmi, ettei yhdysvaikutusta synny, josta johtuen merkitsevyysarvojen tuloksia voidaan pitää luotettavina. Aikaseurannassa näytteiden laboratorioprosessi kesti jokaisen näytteen kohdalla alle 60 minuuttia.

Tuloksista voidaan päätellä, että avotekniikkaa voidaan käyttää -tutkimuksen näytteenottotekniikkana. Tilastollisesti merkittävää eroa tekniikoiden välille ei syntynyt eikä yhdysvaikutuksesta aiheutunut testin luotettavuuteen vaikuttavia tekijöitä. Tulokset ovat suuntaa antavia. Aikaseuranta osoittaa, että NH_4 -näytteet analysoidaan määrääjän sisällä alle 60 minuutissa näytteenotosta.

Avainsanat	NH ₄ , spiroergometria näytteenottotekniikka	laktaattinäyttein	-tutkimus,
------------	--	-------------------	------------

Author	Minna-Maaria Keinänen
Title	The Effect of Sample Technique Selection on NH ₄ -ion Concentration in Lactate Exercise Test
Number of Pages	31 + 2 appendices
Date	18 April 2012
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Senior Lecturer Hilikka Tukkiniemi , Bachelor of Health Care Helena Honkala
<p>The objective purpose of this study was to find out if the selection of sample technique had an effect on the concentration of the ammonium-ion (NH₄) sample in a clinical exercise test. NH₄-ion is sensitive for evaporation and, for that reason, it should be analyzed in 60 minutes after the sampling. It is recommended that an NH₄-sample should be taken with the vacuum technique, but in problematic cases the open technique has been used too. The aim of this study was to find out if there were statistically remarkable differences in NH₄-ion concentration between the open technique sample and the vacuum technique sample. I also documented sample delay times to find out if NH₄-samples were analyzed in their time frame.</p> <p>The data for this study was collected by analyzing 45 pairs of NH₄-samples from five different patients. One of the pairs was taken by the using vacuum technique and the other with the open technique. All samples were analyzed with the Cobas Integra 400 Plus analyzer. The time frame study was executed by documenting sample delay times in four different laboratory process stations.</p> <p>The results showed that the difference between these sample techniques was not statistically remarkable in four cases of five. Two-Way Repeated-Measures ANOVA showed that there were no statistically remarkable influence when the study was made. All of the samples were analyzed in 60 minutes from the sampling.</p> <p>The results lead to the conclusion that the open technique may be used in lactate exercise test. While there were neither statistically remarkable differences in p-values or any artifact was located, the results are reliable. The time frame study showed that every sample was analyzed in their time frame (60 minutes). This also increased the reliability of this study.</p>	
Keywords	NH ₄ , lactate, sample technique

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Spiroergometria, laktaattinäyttein	2
2.1	Spiroergometrian mittaussuureet	2
2.2	Vasta-aiheet ja tutkimuksen keskeyttämisen syyt	5
2.3	Spiroergometria laktaattinäyttein -tutkimus	6
3	Ammonium-ioni	8
3.1	Ammonium-ionin syntyminen ihmiskehossa	8
3.2	Ammonium-ioni näytteen tutkiminen ja näytteenotto	9
4	Näytteenottotekniikat	11
4.1	Vakuumitekniikka	11
4.2	Avonäytetekniikka	11
5	Spiroergometria laktaattinäyttein -tutkimuksen kulku	12
5.1	Esivalmistelut	12
5.2	Alkutoimet kiinisen fysiologian laboratoriossa	13
5.3	Rasitusvaihe	14
6	Tutkimuskysymykset	15
7	Tutkimuksen suorittaminen	16
7.1	Tutkimushenkilöt	16
7.2	Tutkimuslaitteet	16
7.3	Tutkimuksen suoritus	17
8	Tulokset	20
8.1	Näytetekniikoiden vaikutus NH_4 -näytteen pitoisuuteen	20
8.2	Viiveaikaseuranta	24
9	Pohdinta	26
	Lähteet	31
	Liitteet	

Liite 1. Potilaskohtaiset NH_4 -tulokset

Liite 2. NH_4 -ioni näytteiden laboratorioanalyysiprosessin aikaseuranta

1 Johdanto

Spiroergometria laktaatti-, ammoniakki- ja verikaasunäyttein on kliinisen fysiologian laboratoriossa käytössä oleva tutkimus, jonka avulla pyritään selvittämään lihasmetabolisia sairauksia. Tutkimuksessa mitataan verikokeiden avulla laktaatin, ammonium-ionin ja verikaasujen arvoja, joiden kohoamista rasitusvaiheessa ja palautumista lepovaiheessa lähtötasoonsa seurataan läpi tutkimuksen. (Haapalahti 2009: 1.) Spiroergometriatutkimus laktaattinäyttein on melko harvinainen tutkimus, mutta sen kliininen merkitys potilaan diagnoosissa on merkittävä.

Ammonium-ioninäyte otetaan ammoniakki-näytteenä. Ammoniakin yhtenä kemiallisena ominaisuutena on herkkä haihtuvuus, molekyylin joutuessa tekemisiin ilman kanssa. Tästä syystä ammoniakki-näytteistä on annettu suositus, jonka mukaan kyseiset näytteet tulee ottaa vakuumitekniikalla näytteenottotilanteissa. Kyseistä käytäntöä ei kuitenkaan ole mahdollista noudattaa joka tilanteessa. Opinnäytetyön tilaajan kautta haastateltiin Meilahden kliinisen fysiologian laboratorion ylilääkäri Päivi Piirilää. Haastattelussa kävi ilmi, että potilaiden yksilöllisten erojen vuoksi laktaattirasituksen verinäytteitä ei aina pystytä ottamaan vakuumitekniikalla, jota ammoniakki-näyte vaatisi. Koska - tutkimuksen kannalta on tärkeää saada näytteet otettua tietyissä tutkimuksen vaiheessa, on näytteet otettu ongelmatilanteissa valuttamalla, niin kutsuttuina avonäytteinä. (Piirilä 2011.) Täten kliinisen fysiologian laboratoriossa heräsi tarve tutkia, onko näytteenottotekniikalla merkitystä ammonium-ioninäytettä otettaessa näytteen pitoisuuteen. Vastaavanlaisista tutkimuksista ei ole tutkimustietoa saatavilla.

Opinnäytetyöni tarkoituksena on selvittää, onko vakuumitekniikalla ja avotekniikalla otetuissa ammonium-ioni näytteiden näytepitoisuuksissa tilastollisesti merkittävää eroa. Lisäksi suoritan tutkimuksen yhteydessä viiveaikaseurannan jokaisen näytteen kohdalla. Työn tuloksilla on merkitystä spiroergometria laktaattinäyttein -tutkimuksen suoritukseen tulevaisuudessa, koska ne antavat tietoa kyseisen tutkimuksen kohdalla näytteenottotekniikan vaikutuksesta näytteen tuloksiin. Työssäni ammonium-ionista käytetään molekyylin kemiallista kaavaa NH_4 – nimeä.

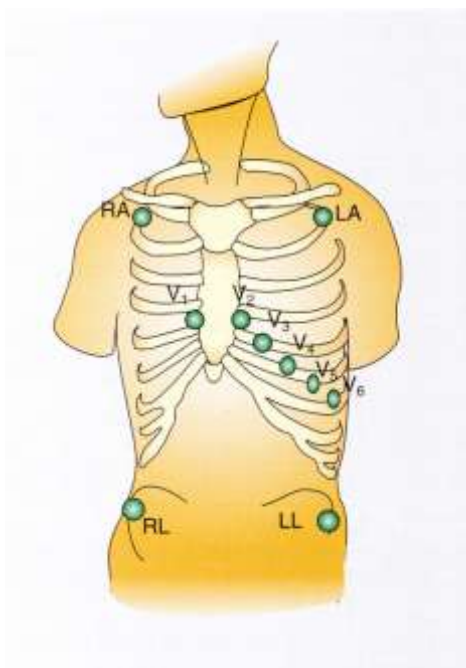
Opinnäytetyöni toteutettiin Meilahden klinisen fysiologian laboratorion tilauksesta. Tutkimus toteutetaan Meilahden klinisen fysiologian laboratoriossa ja näytteiden analysointi Meilahden klinisen kemian laboratoriossa.

2 Spiroergometria, laktaattinäyttein

Spiroergometria on tutkimus, jolla tutkitaan kardiorespiratorisen suorituskyvyn rajoittumisen astetta ja mekanismeja. Spiroergometrian perustutkimuksella tarkoitetaan kaasujenvaihdunnan mittausta ergometrisen rasituskokeen yhteydessä. Tutkimuksella voidaan antaa kliiniseen käyttöön monipuolinen kuva yksilön aerobisesta kaasujenvaihtokapasiteetista, anaerobisen metabolian ilmaantumisherkkyydestä sekä ventilaation määrään liittyvistä poikkeavuuksista suhteessa hapen kulutukseen, hiilidioksidin tuottoon ja rasitusasteeseen. Tärkeää lisäinformaatiota antaa hapenkulutuksen suhteuttaminen sydämen lyöntitaajuuteen rasituksen aikana. (Sovijärvi, 2003b: 245.) Spiroergometria laktaattinäyttein -tutkimus perustuu vahvasti spiroergometria tutkimukseen. Spiroergometriassa mitattavien tutkimusfunktioiden lisäksi, spiroergometria laktaattinäyttein -tutkimuksessa mitataan verikokeiden avulla laktaatti-, ammoniakki- ja laskimoveren happisaturaatioarvoja. Tutkimusta käytetään lihasmetabolian sairauksien diagnostiikassa sekä riskin, hoitovasteen ja työkyvyn arvioinnissa. (Haapalahti 2009: 1.)

2.1 Spiroergometrian mittaussuureet

Spiroergometria tutkimukseen sisältyy monia eri mittauksia. Sydänkäyrää (EKG) mitataan jatkuvana läpi tutkimuksen digi-EKG:nä, jolloin pystytään seuraamaan sydänperäisiä muutoksia levossa, rasituksessa ja palautumisvaiheessa. Levossa mittaukset suoritetaan 12-kytkentäisenä normaalin lepo-EKG mukaisesti, jolloin elektrodit on kiinnitetty rintakehälle ja raajoihin. Rasituksen aikainen EKG rekisteröidään Mason-Likar, 12-kytkentäjärjestelmällä, jossa raajaelektrodit on tuotu vartalon tyveen, solisluun alle ja suoliluun harjanteen yläpuolelle. (Sovijärvi 2003a: 339.) Kuviossa 1 on havainnollistettu rasituskytkentöjä.



Kuvio 1. Mason-Likar kytkennät. Yläraajaelektrodit (RA, LA) kiinnitetään fossa subclavicutiksiin, alaraajaelektrodit (RL, LL) spina iliaca ventralisten kohdalle. (Sovijärvi 2003a: 339.)

Syketaajuus rekisteröidään automaattisesti EKG-mittauksessa. Maksimisyke tarkastetaan kuitenkin jälkikäteen manuaalisesti, jotta pystytään sulkemaan pois häiriöisen signaalin aiheuttamat virheet. (Haapalahti 2009: 5.)

Verenpainetta mitataan tutkimuksen aikana useasti. Verenpaine mitataan olkavarresta käsikäyttöisellä manometrillä. Mittauksia suoritetaan levossa sekä makuulla että istuen, rasituksessa jokaisen kuormaportaan lisäyksen jälkeen ja palautumisvaiheessa useaan kertaan. Mittaustarkkuudessa tavoitellaan levossa 2 mmHg ja rasituksessa 5 mmHg tarkkuuta systoliseen ja diastoliseen paineeseen. (Haapalahti 2009: 1, 5.)

FEV₁ eli uloshengityksen sekunttikapasiteetti mitataan spiometria puhalluksena lähtötilanteessa sekä rasituksen jälkeen heti, 4 minuutin ja 10 minuutin kohdalla. Tarvittaessa mittaus voidaan suorittaa myös useammin tai myöhemminkin, jos potilaalla ilmenee merkittävä keuhkoputkien supistumisreaktio. Puhalluksia tehdään 2-3, joista mittausarvoksi valitaan paras arvo. Puhallusten täytyy olla toistettavia, jotta arvo olisi luotettava. Merkittävä muutos lähtöarvoon verrattaessa on 15 %. FEV₁ mittauksista arvioidaan myös kokonaisvaihtelua, joka lasketaan kaavalla: suurin arvo – pienin arvo / lähtöarvolla. Mikäli arvo kohoaa >20 %, tämä saattaa olla viittaus

bronkiaaliseen labiliteettiin, jolla puolestaan olisi viittausta astmaattiseen taipumukseen. (Haapalahti 2009: 5.)

SpO₂ eli valtimoveren happikyllästeisyys rekisteröidään pulssioksimetrillä. Teknisesti luotettavat signaalit eli ne, joissa monitorin syketaajuus on sama kuin EKG:llä mitattu, kirjataan digi-EKG rekisteröintiohjelmaan. Merkittävä muutos SpO₂-arvossa on kolmen prosenttiyksikön muutos, kun verrataan arvoa lähtöarvoon. (Haapalahti 2009: 5.)

Subjektiiiviset tuntemukset kirjataan digi-EKG-rekisteröintiohjelmaan. Rasittavuuden arviointi suoritetaan käyttäen Borgin asteikkoa (1-20). Rintakivun ja hengenahdistuksen arviointiin voidaan käyttää erillistä Borgin asteikkoa (1-10). Tuntemuksia kysellessä on syytä kiinnittää huomiota johdattelemattomaan kysymys muotoon. (Haapalahti 2009: 5.)

Kaasujenvaihduntaa mitataan spiroergometrianaamarin kautta, joka on yhdistetty mittaussilaukseen. Mittaukset voidaan suorittaa myös suukappaleen avulla, mikäli esteitä naamarin käyttöön ilmaantuu. (Piirilä 2011.)

Virtaustilavuusmittauksia suoritetaan rasituksen aikana jokaisella kuormaportaalla. Potilasta voidaan pyytää suorittamaan virtaustilavuussilmukoita pyytämällä potilasta vetämään keuhkot täyteen ilmaa ja palaamalla sitten normaali hengitykseen. Kokonaissuorituskykyä arvioidaan rasituksen kolmen viimeisen minuutin keskimääräisenä kuormana, W_{max3}. (Haapalahti 2009: 6.)

Lisäksi tutkimusta varten lasketaan potilaan maksimisuoritusaso. Maksimitaso lasketaan potilaan iän mukaan ja ilmaistaan tutkimuksessa odotusarvona potilaan maksimisykkeenä. Maksimisykkeen laskukaava on seuraava:

$$205 - \frac{1}{2} * \text{potilaan ikä vuosina.}$$

Maksimitasoa arvioidaan myös Borgin asteikolla, joka ilmaisee potilaan tuntemusta rasituksen rasittavuudesta. Maksimitaso Borgin asteikolla on 18-19, jolloin rasitus on hyvin rasittavaa. (Haapalahti 2009: 4.)

2.2 Vasta-aiheet ja tutkimuksen keskeyttämisen syyt

Yleisesti kliinistä rasituskoetta, johon spiroergometria laktaattinäyttein -tutkimus spiroergometriakin perustuu, ei suoriteta alle 6-vuotiailla lapsilla. Syyksi tähän on esitetty yhteistoiminnan kyvyn puutetta nuoremmilla potilailla. Yläikärajaa ei ole asetettu, mutta tutkimuksen suoritus vaatii kykyä suorittaa dynaamista rasitusta polkupyörällä, käsikampea pyörittäen tai kävellen kävelymatolla. Taulukossa 1 on esitetty spiroergometrian vasta-aiheet. (Sovijärvi 2003a: 333.)

Taulukko 1. Kliinisen rasituskokeen ehdottomat vasta-aiheet ja suhteelliset vasta-aiheet (Sovijärvi 2003a: 333-334).

Vasta-aiheita tutkimukselle	Suhteellisia vasta-aiheita tutkimukselle
<i>Akuutti infektiosairaus</i>	<i>Nopea eteisvärinä tai -lepatus</i>
<i>Akuutti sydäninfarkti tai sen epäily</i>	<i>Tuoreeksi epäilty vasen haarakatkos</i>
<i>Epästabiili angina pectoris</i>	<i>Hallitsematon hypertensio, lepo-RR >220/120 mmHg (huom. valkotakki reaktio)</i>
<i>Dekompensoitu sydämen vajaatoiminta</i>	<i>Aorttastenoosi</i>
<i>Hoitamaton vaarallinen rytmihäiriö</i>	<i>Vaikea respiratorinen sairaus</i>
<i>II°-III° eteiskammiokatkos</i>	
<i>Akuutti myo-tai perikardiitti</i>	
<i>Metabolinen sairaus tasapainottomassa vaiheessa</i>	
<i>Akuutti keuhkoveritulppa</i>	
<i>Muu akuutti vaikea sairaus</i>	

Rasituskokeessa kuormitusta pyritään jatkamaan sellaiselle tasolle, jossa potilas tuntee rasitustason olevan Borgin asteikolla 18-19/20. Keskeytyksen syyt voidaan jakaa kolmeen luokkaan. (Haapalahti 2009: 5.)

Potilaan tuntemuksia, jotka ovat ehdottomia keskeytyksen syitä: voimakas rintakipu tai hengenahdistus (Borg 4 - 5/10), voimakas väsymys (Borg 19 - 20/20), huimaus/tajunnan hämärtyminen tai jokin muu voimakas oire. (Haapalahti 2009: 5.)

Havaintoja, jotka ovat ehdottomia keskeytyksen syitä: Verenpaineen tai EKG-rekisteröinnin mittausta on teknisesti epäluotettava, iskeemistyyppinen ST-välin nousu, ST-välin lasku ≥ 4 mm, systolisen verenpaineen lasku > 20 mmHg, kammiotakykardia, hemodynaamisesti merkittävä taky- tai bradyarytmia, III^o-eteiskammiokatkoksen ilmaantuminen, rasituksessa ilmenevä voimakas kalpeus/syanoosi. (Haapalahti 2009: 5.)

Harkinnanvaraisia rasituksen keskeyttämisindikaatioita: tutkittavan esittämä toivomus kokeen keskeyttämisestä, kohtalaisen voimakkaat oireet, suorituksen epävarmuus ja huono koordinaatio, lisääntyvät rytmihäiriöt, ST-vajoama > 3 mm, systolisen paineen nousu > 280 mmHg, diastolisen paineen nousu > 130 mmHg, keskivaikea hengityksinsuffissi ($F_{et}CO_2 > 6,7\%$), keskivaikea hypoksemia ($PaO_2 < 8$ kPa, $SpO_2 < 89\%$). (Haapalahti 2009: 5.)

2.3 Spiroergometria laktaattinäyttein -tutkimus

Spiroergometria laktaatti-, ammoniakki- verikaasunäyttein kuuluu erityistutkimuksiin. Spiroergometria laktaattinäyttein -tutkimuksessa otetaan normaalien mittaussuureiden lisäksi laktaatti-, ammoniakki- ja laskimoveren happisaturaatioarvoja seuraavia verinäytteitä. (Haapalahti 2009: 6.)

Spiroergometria laktaattinäyttein -tutkimuksen verinäytteitä otetaan tutkimuksen aikana yhteensä yhdeksän kertaa. Näytteet otetaan ennen rasitusta, kevyessä rasituksessa, maksimirasituksessa ja palautumisvaiheessa 2, 4, 6, 10, 20 ja 30 minuuttia rasituksen päättymisestä. Laktaattinäyte otetaan fluoridioksalaattiputkeen, ammoniakkinäyte otetaan EDTA-putkeen ja verikaasunäyte otetaan hepariiniruiskuun. Ennen analyysilaboratorioon toimittamista laktaattinäytteet säilytetään huoneenlämmössä, ammoniakkinäytteet jäähauteessa ja verikaasunäytteet kahden kylmägeelipussin välissä. (Haapalahti 2009: 6.)

Näytteenotto tapahtuu potilaan laskimoon asennetun kanyylin kautta. Lääkäri asentaa kanyylin, kun potilas on levännyt hetken ja elintoiminnot ovat tasaantuneet. Kanyylin asennuksen jälkeen potilas lepää vielä hetken ennen ensimmäisiä lepovaiheen verinäytteitä. (Piirilä 2011.)

Normaali laktaattitason nousu rasituksessa on 3-5 kertainen lähtötasoon verrattuna. Tavallista korkeammat laktaattitason nousut rasituksessa voivat viitata lihasten mitokondriotauteihin. Laktaattin nousu voi olla vaimeaa tai puuttua kokonaan anaerobiseen glykolyysiin liittyvissä entsyymien puutostiloissa esimerkiksi McArdlen taudissa. Ammoniakkiarvon odotetaan rasituksessa nousevan 50-55 $\mu\text{mol/l}$ lähtötasosta. Matalat arvot tai vastaavasti hyvin korkeat arvot voivat viitata lihasmetabolian häiriöön. Sekä ammoniakkiarvo että laktaattiarvo on kuitenkin suhteutettava myös rasitusasteeseen. Laskimoverestä otettava happisaturaatio voi normaalisti hieman laskea kevyessä rasituksessa. Mikäli happisaturaatioarvo on koholla rasituksessa, se saattaa olla viittaus lihasmetabolian häiriöön. Taulukossa 2 on esitetty mittausarvojen normaalit vaihteluvälit. (Haapalahti 2009: 6.)

Taulukko 2. Laktaatti-, ammoniakki- ja laskimoveren happisaturaatioarvojen viitearvot ja normaalialue tutkimuksen eri vaiheissa (Haapalahti 2009: 6–7.)

Laktaatti (mmol/l)		
	viitearvo	normaalialue
lepo	1,47	0,7-2,2
kevyt rasitus	1,59	0,9-5,3
maksimirasitus	8,13	6,0-10,0
2 min. Rasituksen jälkeen	12,58	10,9-15,3
4 min. Rasituksen jälkeen	12,64	10,0-15,3
6 min. Rasituksen jälkeen	12,82	10,0-15,5
10 min. Rasituksen jälkeen	10,92	9,0-12,9
20 min. Rasituksen jälkeen	7,98	6,0-10,0
30 min. Rasituksen jälkeen	5,9	

Ammoniakki ($\mu\text{mol/l}$)		
	viitearvo	normaalialue
lepo	23	12,0-33
kevyt rasitus	22,33	12,0-32
maksimirasitus	70	38-110
2 min. Rasituksen jälkeen	104,44	69-140
4 min. Rasituksen jälkeen	96,63	31-128
6 min. Rasituksen jälkeen	96,75	45-126
10 min. Rasituksen jälkeen	66,5	50-84
20 min. Rasituksen jälkeen	42,57	29-57
30 min. Rasituksen jälkeen	26,3	

Laskimoveren O₂-saturaatio (%)		
	viitearvo	normaalialue
lepo	67,42	50-84
kevyt rasitus	50,92	32-70
maksimirasitus	66,97	39-95
2 min. Rasituksen jälkeen	84,96	77-93
4 min. Rasituksen jälkeen	83,4	65-100
6 min. Rasituksen jälkeen	84,74	72-98
10 min. Rasituksen jälkeen	78,73	56-102
20 min. Rasituksen jälkeen	76,36	58-94

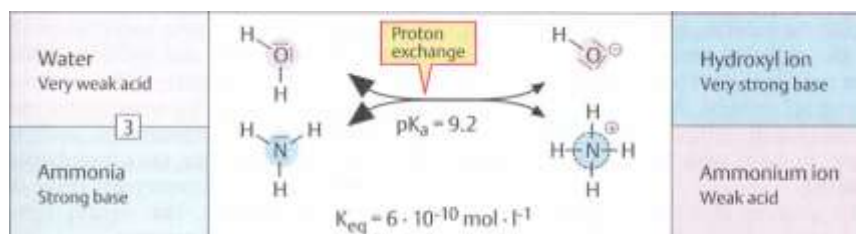
3 Ammonium-ioni

Opinnäytetyön tutkimuksen kiinnostuksen kohteena on ammonium-ioni. Tästä syystä työssäni keskityn ammonium-ionin tutkimiseen ja teoria-aineistoon. Laktaatti ja verikaasuanalyysi ovat kuitenkin myös tärkeä osa spiroergometria laktaattinäyttein - tutkimusta.

3.1 Ammonium-ionin syntyminen ihmiskehossa

Ammonium-ioni syntyy, kun emäksinen ammoniakki (NH_3), joka on voimakas emäs, vastaanottaa protoneja vesimolekyyliltä, joka on hyvin heikko happo. Tämän tapahtuman seurauksena syntyy hydroksyyli-ioneja (OH^-) ja positiivisesti varautuneita

ammonium-ioneja (NH_4^+). Hydroksyyli-ioni on voimakas emäs ja ammonium-ioni puolestaan heikko happo. Ammoniakin muuntuminen ammonium-ioniksi on esitetty kuviossa 2. (Koolman – Roehm 2005: 30.)



Kuvio 2. Ammoniakin muuttuminen ammonium-ioniksi (Koolman–Roehm 2005).

Ammonium-ioni on hermokudokselle myrkyllinen ja normaalitilanteessa ammoniakkia on seerumissa hyvin vähän. Suurinosa veren ammoniakista on peräisin suolistosta, jossa bakteerit hajottavat sekä aminohappoja että amiineja ammoniakin vapautuessa ja imeytyessä portilaskimoon. Terveellä henkilöllä maksa kykenee huolehtimaan aiheutuneesta ammoniakki määrästä ja käyttämään sen joko virtsa-aineen tai amiinien synteesiin. Ammoniakinäytteen plasman viitearvo terveillä ei-tupakoivilla henkilöillä on $< 50 \mu\text{mol/l}$. (Penttilä 1998: 169.)

3.2 Ammonium-ioni näytteen tutkiminen ja näytteenotto

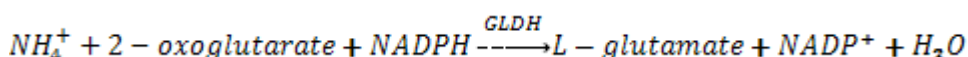
Ammonium-ioni pitoisuutta tutkitaan yleensä epäiltäessä maksainsuffiensiä, eli maksan toiminnan vajausta tai neonataalista hyperammonemiaa, eli vastasyntyneiden ammoniakin liikatuotantoa. Näyte voidaan pyytää myös eräiden lääkkehoitojen kuten valproaatin seurannassa. Paastoa pidetään välttämättömänä, mutta vastasyntyneillä ja päivystystapauksissa edetään kliinisen tilanteen mukaan. (Uotila 2009: 1.)

Näyte otetaan laskimonäytteenä kyynärtaipeen suonesta tai lapsilla kantapäästä. Näytemäärän tulee olla aikuisilla vähintään 1 ml plasmaa ja lapsilla vähintään 0.2 ml plasmaa. Ammonium-ioni otetaan K2-EDTA-vakuumputkeen. Näyte tulee ottaa kylmänäytteenottona mahdollisuuksien mukaan ilman kiristyssidettä. Välittömästi näytteenoton jälkeen näyte sekoitetaan ja laitetaan jäämurskaan. Näyte kylmäseentrifugoidaan ja määritetään heti erottelemattomasta plasmasta. Plasma

voidaan myös erottaa välittömästi sentrifugoinnin jälkeen ja toimittaa mahdollisimman nopeasti kylmälähetyksenä analyysilaboratorioon. Määritys on tehtävä tuoreesta plasmasta 60 minuutin kuluessa näytteenotosta. Ellei näytteen toimitus laboratorioon onnistu näissä viiterajoissa, plasma on pakastettava ja lähetettävä analyysilaboratorioon pakastettuna. (Uotila 2009: 1.)

Ammonium-ioni määrittäminen tehdään päivittäin ja kaikkina vuorokauden aikoina. Tulokset ovat saatavana samana päivänä kun näyte saapuu laboratorioon. Viitearvot ovat alle 7 päivän ikäisillä lapsilla 30 - 140 µmol/l ja yli 7 päivän ikäisillä lapsilla ja aikuisilla alle 50 µmol/l. (Uotila 2009: 1.)

Ammonium-ioni pitoisuutta voidaan mitata entsymaattisella menetelmällä. Yksi tällaista menetelmää hyödyntävä analysaattori on Cobas Integra 400 Plus. Analysaattori käyttää entsymaattista, glutamaattidehydrogenaasia hyödyntävää menetelmää. Glutamaatti dehydrogenaasi (GLDH) katalysoi 2-oxoglutaratin pelkistymistä NH_4^+ :sta ja NADPH:sta glutamaatiksi ja NADP^+ :ksi. (Cobas INTEGRA 400/700/800 2000: 1.)



Ammonium-ioni pitoisuus analysoidaan plasmasta, joka ei ole hemolysoitunut tai lipeeminen. Näyte tulee ottaa viilenettyyn EDTA-näyteputkeen, joka välittömästi näytteenoton jälkeen siirretään jäähauteeseen ja sentrifugoidaan mahdollisimman nopeasti näytteenoton jälkeen. Hemolyttistä näytettä ei voida analysoida, sillä punasolujen sisältämä ammoniakkipitoisuus on kolminkertainen verrattuna plasman pitoisuuteen. Lipeemisiä näytteitä ei tulisi analysoida, mutta akuuteissa tapauksissa näytteet joiden lipeemisyystaso on <400 mg/dl voidaan analysoida. Näissä tapauksissa lipemian vaikutus tulee kuitenkin ottaa huomioon tuloksia arvioidessa. Ikteeninen näyte on analysoitavissa jos bilirubiini taso on <188 µmol/l. γ-Globuliini vaikuttaa merkittävästi ammoniakkin pitoisuuteen kun määrä ylittää 3 g/dl. (Cobas INTEGRA 400/700/800 2000: 1–2.)

Ammonium-ioni muodostuu elimistön aineenvaihdunnassa, proteiinien kataboliassa. Tavallisesti suurin osa imeytyy suolistosta portaverenkierron kautta maksaan. Korkea NH_4 -ioni-pitoisuus häiritsee aivojen aineenvaihduntaa ja voi johtaa maksakoomaan. Korkeita ammonium-ioni pitoisuuksia voidaan tavata maksataudeissa, kohonneessa

portaverenkierron paineessa, suolisto verenvuodoissa, valproaattihoidossa ja munuaisten vajaatoiminnassa. Lievempiä nousuja voidaan tavata elektrolyytti- ja happoemästasapainon häiriöissä, proteiinipitoisen dieetin vaikutuksesta, infekzioissa tai fyysisen rasituksen vaikutuksesta. (Uotila 2009: 1-2.)

4 Näytteenottotekniikat

4.1 Vakuumitekniikka

Vakuuminäytteenottotekniikka perustuu suljettuun järjestelmään. Vakuumiputkessa on tarkoin mitoitettu alipaine, joka ei tiiviin korkin ansiosta pääse karkaamaan.

Näytteenottoputkesta riippuen alipaine voi vaihdella. Tekniikan ansiosta verinäytteenotossa saadaan otettua tarkoin määritelty määrä verta näyteputkeen. Veri kulkee suljetussa järjestelmässä, jolloin veren pääsy näyteputken ulkopuolelle on käytännössä minimaalinen. (Tuokko – Rautajoki - Lehto 2008: 46.)

Vakuumitekniikalla otetusta verinäytteestä ei haihdu huoneilmaan kaasuja, joten se soveltuu haihtuvien verinäytteidenottoon hyvin. Tekniikka on turvallinen näytteenottajalle, potilaalle ja ympäristölle. (Tuokko – Rautajoki - Lehto 2008: 46.)

4.2 Avonäytetekniikka

Avonäytteenottotekniikka perustuu potilaan oman verisuonen tuottamaan paineeseen. Kun näytteenottoneula viedään suoneen, veri alkaa valua näyteputkeen omalla paineellaan. Näytteenottajan tulee arvioida veren määrä näyteputkeen ja paine, jolla veri suonesta tulee. Lisäainetta sisältävissä putkissa (kuten EDTA-näyteputki) veren määrä tulee arvioida tarkasti merkkiviivaan, jotta poikkeamat lisäaineen ja veren suhteessa eivät aiheuta poikkeamia tuloksiin. (Tuokko – Rautajoki – Lehto 2008: 49 - 50.)

Neulan kannan kontaminoituminen on todennäköisempää avotekniikassa. Näytteen kontaminoituminen esimerkiksi kudoksenesteellä vaikuttaa varsinkin hyytymistutkimuksiin ja plasman kaliumtuloksiin. Avotekniikan avoimen näytteenottojärjestelmän vuoksi, avoimesta näyteputkesta on mahdollisuus haihtua mitattavia kaasupitoisuuksia. (Tuokko – Rautajoki – Lehto 2008: 49.)

5 Spiroergometria laktaattinäyttein -tutkimuksen kulku

Spiroergometria laktaattinäyttein -tutkimus suoritetaan pääosin aina polkupyöräergometriana ja lääkärin välittömässä läheisyydessä. Rasitusastetta kasvatetaan portaittain vähintään 90% tasolle potilaan maksimitasosta (Borg 18-19), ellei potilaalla ennen sitä ilmaannu tutkimusta rajoittavia oireita tai tutkimuslöydöksiä, jotka edellyttävät tutkimuksen keskeyttämistä. Kokeen aikana rekisteröidään monia muuttujia. Jatkuvasti mitattavia muuttujia ovat EKG, oksimetrisignaali, hengitystaaajuus, uloshengitysilman happi- ja hiilidioksidipitoisuus ja niiden avulla lasketut erilaiset indeksit. Lisäksi tutkimuksessa seurataan verenpainetta, FEV₁-arvoja sekä subjektiivista rasitusentuntemusta rasitusvaiheessa käyttäen Borgin asteikkoa. (Haapalahti 2009: 1.)

5.1 Esivalmistelut

Tutkimuksen kannalta potilaan esivalmistelulla on suuri merkitys luotettavien tulosten saamiseksi. Monilla lääkeaineilla on vaikutusta mitattaviin kardiorespiratorisiin vasteisiin, joten diagnostisessa tutkimuksessa tällaiset lääkkeet jätetään pääsääntöisesti tauolle. Muissa kysymyksenasetteluissa tutkimus pyritään suorittamaan potilaan optimaalisen lääkityksen aikana. (Haapalahti 2009: 2.)

Luotettavien tutkimustuloksien saamiseksi potilaan tulisi olla ennen tutkimusta neljä tuntia tupakoimatta, kaksi tuntia ilman kahvia, teetä tai muita piristäviä aineita sekä 1 1/2 vuorokautta ilman alkoholia. Raskasta ateriointia tulee välttää, mutta tutkimukseen ei saa kuitenkaan tulla ravinnotta. (Haapalahti 2009: 2.)

5.2 Alkutoimet kiinisen fysiologian laboratoriossa

Potilas saapuu laboratorioon hyvissä ajoin ennen tutkimuksen alkua. Hänet ohjataan vaihtamaan rasituskokeeseen soveltuva vaatetus ja jalkineet. Miehillä ylävartalo tulee jättää paljaaksi ja naisilla voidaan jättää rintaliivit puettavaksi elektrodien päälle. (Haapalahti 2009: 3.)

Tutkimustilassa potilaalta mitataan paino ja pituus, mikäli näistä ei ole luotettavaa tietoa. Lähetteestä tarkastetaan potilaan mahdolliset lääketauot ja kyselemällä selvitetään potilaan normaalisti käytössä oleva lääkitys. Tiedot kirjataan tutkimustietoihin. (Haapalahti 2009: 3.)

Ennen mitään varsinaisia mittauksia säädetään polkupyöraergometrin satulan korkeus sopivaksi potilaalle. Kun potilas suorittaa kevyitä koepolkaisuja, voidaan samalla todeta mahdollisia polkemista rajoittavia tekijöitä. Potilas suorittaa istuma-asennossa spirometria puhalluksia, joiden avulla selvitetään uloshengityksen sekunttikapasiteettia, FEV₁. Tästä arvosta pystytään arvioimaan henkilön maksimiventilaatio (MVV, 38 * FEV₁). (Haapalahti 2009: 3.)

Tutkimuksen aikainen EKG-signaali tulee olla mahdollisimman laadukas. Iho valmistellaan huolellisesti tutkimusta varten. Ihokarvat ajetaan pois ennen elektrodien kiinnitystä, ihorasva poistetaan puhdistusaineella ja ihoa hangataan hiekkapaperiliuskalla mahdollisimman hyvän kiinnityksen ja signaalin saamiseksi. Potilaalta otetaan ensin lepovaiheessa 12-kytkentäinen EKG-tuloste normaaleilla lepo-EKG – kytkennöillä. Tämän jälkeen kytkennät muutetaan Mason-Likar – kytkentöihin, joita käytetään rasituksen aikana. Mason-Likar – kytkennöistä otetaan myös lepoelokuva. (Haapalahti 2009: 3.)

Potilas jatkaa EKG-mittausten jälkeen lepovaihetta aina rasituksen alkamiseen asti. Lepovaiheen aikana lääkäri käy asentamassa potilaalle laskimokanyylin, jonka kautta tutkimuksen verinäytteet otetaan. Kanyylin asennuksen ja ensimmäisten verinäytteiden välillä tulisi olla vähintään 15 minuutin lepotauko. Verinäytteet otetaan tauon jälkeen ja

toimitetaan analyysilaboratorioon mahdollisimman nopeasti näytteenoton jälkeen. (Piirilä 2011.)

Lepoverenpaine mitataan potilaalta maaten auskultatorisella menetelmällä. Mansetin valinta tapahtuu käsivarren koon mukaan ja se tulee kiinnittää niin, ettei mansetti valu tutkimuksen aikana. Potilaan korvalehteen ja sormeen kiinnitetään pulssioksimetrian turit ja sykkeen tasaannuttua vastaamaan digi-EKG:n vastaavaa arvoa, happisaturaatio kirjataan ohjelmaan. Hengitysfrekvenssi pyritään mittaamaan huomaamattomasti, jotta arvo olisi luotettava potilaan normaali hengitystystiheys. (Haapalahti 2009: 3.)

Lääkäri haetaan edellisten alkutoimien jälkeen tutkimushuoneeseen. Valvova lääkäri suorittaa kliinisen esitutkimuksen haastatteleamalla potilasta, kuuntelemalla hengitys- ja sydänäänet sekä palpoimalla potilaan rintakehää, mikäli potilas on tullut tutkimuksiin rintakipujen vuoksi. Haastattelussa keskitytään oireisiin, joiden vuoksi potilas on tullut tutkimuksiin. Huomiota on myös syytä kiinnittää muihin rasitukseen liittyviin oireisiin, suorituskyykyyn ja liikunnan määrään. Lääkäri huomioi haastattelussa myös kardiovaskulaariset riskitekijät kuten diabeteksen, tupakoinnin tai hypertension. (Haapalahti 2009: 3.)

Kun on varmistettu, että kokeen suorittamiselle ei ole mitään vasta-aiheita, lääkäri valitsee sopivan kuormannosto-ohjelman. Potilaalle selostetaan tutkimuksen kulku ja lääkäri vastaa potilaan kysymyksiin, mikäli niitä on herännyt. Potilaan kasvoille asetetaan spiroergometrian naamari, jonka kautta hengityssuureita pystytään mittaamaan rasituksen aikana. Hoitaja varmistaa, ettei ilmavuotoja esiinny mistään kohtaa naamaria. (Haapalahti 2009: 4.)

5.3 Rasitusvaihe

Rasitusohjelma valitaan niin, että maksimirasitustaso saavutettaisiin 6-12 minuutissa rasituksen alkamisesta. Polkupyöräergometriassa käytetään yleensä 3 minuutin porrashjelmaa. Tavallisin rasitusvastus miehille on 50 W/3 minuuttia ja naisille 40 W/3 minuuttia. Lääkäri arvioi vastuksen esitietojen perusteella. Vaihtoehtoisesti ennalta-

asetettuihin vastuksiin voidaan käyttää myös 20 W/2 minuuttia ohjelmaa. Työtehon vakioimiseksi pyritään kierrosnopeuteen 60/minuutti. (Haapalahti 2009: 1-4.)

Potilas nousee polkupyöräergometrin päälle, jolloin otetaan EKG-filmi istuvassa asennossa. Potilas aloittaa rasitusvaiheen nostamalla kierrosnopeuden 60/minuutti. Kuormitusta jatketaan tasolle, joka vastaa Borgin asteikolla 17–19/20, ellei keskeytykselle ilmaannu syitä. (Haapalahti 2009: 1, 4.)

Rasituksen aikana potilaalta mitataan verenpainetta joka rasitusportaalla. Kevyen rasituksen verinäytteet otetaan ensimmäisellä portaalla, kun potilas on polkenut noin 2 minuuttia. Maksimirasitus verinäytteet otetaan viimeisellä portaalla noin minuuttia ennen rasituksen päättymistä. Päättymishetkellä kirjataan ylös tuntemus Borgin asteikolla ja suoritetaan mahdollisimman nopeasti lopetuksen jälkeen spirometria puhallukset. (Piirilä 2011.)

Rasituksen päätyttyä potilas siirtyy makuuasentoon ja palautumisvaihetta seurataan jatkuvasti (Haapalahti 2009: 4–5). Palautumisvaiheen verinäytteet otetaan 2, 4, 6, 10, 20 ja 30 minuutin kuluessa rasituksen päättymisestä. Verenpainetta seurataan niin pitkään, että saavutetaan lähtötasoa vastaava arvo. Mikäli rasituksessa on syntynyt oireita tai poikkeavia EKG-muutoksia, levon tulee jatkua kunnes ne ovat hävinneet. Lääkäri kertoo potilaalle alustavat tutkimuslöydökset sekä varmistaa, että potilas on tietoinen jatko-ohjelmasta. (Piirilä 2011.)

6 Tutkimuskysymykset

Teen opinnäytetyöni Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin Meilahden klinisen fysiologian laboratorion tilauksesta. Työn tavoitteena on selvittää, onko kahdella eri näytteenottotekniikalla otetuissa ammonium-ioni näytteissä merkittävää pitoisuuseroa. Näytteet otettiin Spiroergometria laktaattinäyttein -tutkimuksessa ja tutkittiin näytepareina. Tutkimuksen luotettavuuden takaamiseksi suoritetaan myös aikaseuranta näytteen analyysiprosessista.

Tutkimusongelmat:

1. Onko näytteenottotekniikalla vaikutusta näytepitoisuuteen NH_4 -näytteissä?
2. Toteutuuko ammonium-ioninäytteen tutkiminen 60 minuutissa?

Tutkimuskysymykseen, onko näytteenottotekniikan valinnalla merkitystä NH_4 -näytteen pitoisuuteen, haetaan vastausta asettamalla nollahypoteesiksi, ettei merkittävää eroa tekniikoiden välillä synny. Tulosten käsittelyssä on käytetty parinvertailuasetelmaa ja kaksisuuntaista varianssianalyysia. Näillä menetelmillä saadaan verrattua tekniikoiden eroa tilastollisessa analyysissa luotettavasti. Toiseen tutkimuskysymykseen, analysoidaanko NH_4 -näytteet määreajassa 60 minuutin sisällä, haetaan vastausta viiveaikalomakkeilla kerätyistä minuuttikohtaisista ajoista. Tuloksia analysoidaan excel- taulukkojen pohjalta.

7 Tutkimuksen suorittaminen

7.1 Tutkimushenkilöt

Tutkimusaineiston keräys suoritettiin 11.11. – 12.12.2011 välisenä aikana Meilahden klinisen fysiologian laboratoriossa. Tutkimuksen potilaat valittiin erillisestä tutkimusprojektista, joka toteutettiin samanaikaisesti. Tutkimusprojektista vastaava lääkäri valitsi opinnäytetyötutkimuspotilaat projektin verrokki-, eli terveistä potilaista. Opinnäytetyön potilasmäärä kokonaisuudessaan oli seitsemän potilasta, joista viiden potilaan tutkimustuloksia käsiteltiin. Opinnäytetyön materiaalina toimi spiroergometria laktaattinäyttein -tutkimuksen aikana kerätyt NH_4 -näytteet, joita opinnäytetyötutkimukseen kerättiin yhteensä 45 näyteparia.

7.2 Tutkimuslaitteet

Tutkimuksessani käytin Cobas Integra 400 analysaattoria ja Rotixa 50 RS Hettich sekä Biofuge stratos Heraeus sentrifugeja. Kyseiset laitteet sijaitsevat Meilahden klinisen

kemian automaatiolaboratorissa. Näytteet kuljetettiin klinisen fysiologian laboratoriosta analyysilaboratorioon, jossa materiaalin käsittely tapahtui.

Cobas Integra 400 Plus- analysaattorin ammonium-ioni menetelmä vakioidaan aina, kun reagenssierä vaihtuu. Vakiointi voidaan suorittaa myös, jos kontrollitulokset antavat aiheutta vakioinnin tarkastamiseen. Kontrollit ajetaan kerran päivässä tasoilla 50 $\mu\text{mol/l}$ ja 150 $\mu\text{mol/l}$.

7.3 Tutkimuksen suoritus

Potilaan saapuessa tutkimukseen, hän ilmoittautui kansliassa. Potilas ohjattiin pukuhuoneeseen, jossa hän sai vaihtaa tutkimukseen sopivat vaatteet. Tutkimuksen aluksi tarkistettiin, että potilas oli noudattanut esivalmisteluohjeita. Potilaan pituus ja paino mitattiin, ellei näistä tiedoista ollut ajankohtaista tietoa.

Rasitusvaiheen polkupyöräergometri säädettiin oikealle korkeudelle suorittamalla muutama koepolkaisu. Tämän jälkeen potilas ohjattiin istumaan sängylle ja hänelle kerrottiin kuinka tutkimusta varten mitattavat spirometriapuhallukset suoritetaan. Puhallusten jälkeen potilas kävi lepäämään sängylle, jotta elintoiminnot tasaantuisivat. Potilaalta mitattiin verenpaine ja sydänekäyrää varten potilaan iho valmisteltiin mittauksia varten. Sydänekäyrä otettiin sekä tavallisessa lepo-EKG-kytkennässä että rasitusvaiheen Mason-Likar-kytkennöissä. Lääkäri kiinnitti näytteenottokanyylin potilaan siihen käsivarteen, jossa verenpainemittari ei ollut. Lisäksi potilaan korvalehteen ja sormeen oli kiinnitetty pulssioksimetri, jonka lukemia seurattiin läpi tutkimuksen. Esivalmisteluiden jälkeen lääkäri saapui paikalle ja suoritti potilaan haastattelun.

Ensimmäiset verinäytteet otettiin, kun lepovaihetta oli kestänyt noin 15 minuuttia. Näytteenotto suoritettiin jokaisessa näytteenottovaiheessa samalla tavalla. Kanyylista poistettiin mandriini, joka toimi tukkeena kanyylissa. Kanyylista valutettiin hieman verta hukkaan putkeen tai paperiin niin kutsutusti hukkanäytteenä. Hukkanäyte on tarpeellinen ja välttämätön, jotta verinäytteiden tulokset olisivat mahdollisimman luotettavat. Hukkanäytteen jälkeen toinen tutkimushoitaja ojensi avatun EDTA-näyteputken, johon valutettiin kanyylista tutkimukseen tarvittava määrä verta.

Opinnäytetyötä varten otettava avonäyte otettiin tällä tekniikalla. Avonäytteenoton jälkeen kanyyliin kiinnitettiin holkki, jossa oli kumisuojuksella suojattu neula. Vakuumi NH_4 -ioni näyte otettiin käyttämällä tätä tekniikkaa. Loput verinäytteet otettiin samalla näytteenottotekniikalla, työntämällä vakuuminäyteputki holkkiin, jolloin putkessa olevan alipaineen ansioista putki täyttyi merkkiviivaan asti. Näytteenottoputkiin liimattiin potilaskohtainen näytetarra välittömästi näytteenoton jälkeen. Viimeisen näytteen jälkeen kanyyliin laitettiin uusi mandriini. Mandriini vaihdettiin jokaisen näytteenoton jälkeen.

Näytteenottoputket oli numeroitu numeroilla 1–9, jotka kuvasivat näytteenottojärjestystä. Avonäyteputken näytekorkki oli merkitty mustalla ympyrällä, jotta avo- ja vakuuminäytteet tunnistettaisiin toisistaan. Ammonium-ioni näytteiden näytteenottoputket säilytettiin jäähauteessa aina näytteenottohetkeen saakka. Näytteenoton jälkeen näyteputket siirrettiin pienempään jäämurskalla täytettyyn astiaan, jossa ne kuljetettiin analyysilaboratorioon.

Ensimmäisen näytteenoton jälkeen hoitaja vei kaikki lepovaiheen verinäytteet analyysilaboratorioon. Verinäytteet tuotiin Meilahden klinisen kemian laboratoriossa sairaalan sisäisten näytteiden vastaanottopisteeseen, jossa ne jäähauteessa odottivat sentrifugoimista. Spiroergometria laktaattinäyttein -tutkimuksen kaikkien verinäytteiden kanssa toimittiin samalla tavoin. Osa tutkimuksen näytteistä saapui laboratorioon samalla kertaa johtuen näytteenottokertojen välien lyhykäisyydestä.

NH_4 -näytteet sentrifugoitiin näytepareina. Potilas 1 ja potilas 2 näytteet sentrifugoitiin Biofuge stratos Heraeus sentrifugilla 2500 G, 10 minuuttia lämpötilassa 18 °C. Potilas 3 ja potilas 4 näytteet sentrifugoitiin Rotixa 50 RS Hettich sentrifugilla 2000 G, 10 minuuttia lämpötilassa 6 °C. Potilas 5 näytteet sentrifugoitiin samalla sentrifugilla kuin potilas 3 ja potilas 4 näytteet 3000 G, 10 minuuttia 20 °C. Lisäksi tutkimuksesta hylätyt potilas 6 ja potilas 7 näytteet sentrifugoitiin Rotixa 50 RS Hettich sentrifugilla 2000 G, 10 min 6 °C. Sentrifugoinnin jälkeen näytteet kuljetettiin välittömästi analysaattorille, jossa avonäytteet merkittiin näyteviivakooditarralla. Näytteet eivät siirtyneet jäähauteessa vaan olivat huoneenlämmössä sentrifugauksen ja analyysivaiheen välisen ajan. Potilas 6 lipeemiset näytteet hylättiin sentrifugoinnin jälkeen, sillä lipeemisyydestä johtuen kyseisiä näytteitä ei pystytty analysoimaan. Potilas 7 kohdalla

osa näytepareista ei läpikäynyt samaa sentrifugointi prosessia, josta syystä näytteet asetettiin tarkkailun alaisiksi.

Ammonium-ioni näytteet analysoitiin Cobas Integra 400 Plus analysaattorilla, entsymaattisella glutamaattidehydrogenaasi menetelmällä. Analyysi tapahtui näytepareina, jolloin samalla kertaa otetut avo- ja vakuuminäyte siirtyivät analyysivaiheeseen samaan aikaan. Näytteet asetettiin näytepidikkeeseen siten, että vakuuminäyte oli ennen avonäytettä, mutta saman näytteenottokerran näytteet olivat peräysten pidikkeessä. Näytepidike siirrettiin analysaattoriin, josta analysaattori automaattisesti haki näytteet analysoitavaksi.

Näytteiden tulokset siirtyivät automaattisesti analysaattoriin yhdistettyyn tietokoneeseen. Avonäytetekniikalla otetut NH_4 -näytteet etsittiin viivakooditarran avulla tietokoneelta manuaalisesti ja tulostettiin välittömästi. Tulosteisiin kirjattiin potilaan numero, näytteen numero sekä päivämäärä esimerkiksi Potilas 1, näyte 3, 12.11.2012. Vakuuminäytteen tulokset saatiin kemistiltä, joka muokkasi tulosteita siten, ettei potilaan henkilötietoja pystytty jäljittämään. Potilas 7 näytepareissa, joita ei oltu käsitelty täysin samalla tavalla, huomattiin suuria pitoisuuseroja. Koska näytteet oli käsitelty eri tavoin sentrifugointivaiheessa, ei näytteiden tuloksia pidetty luotettavina ja ne hylättiin opinnäytetyön tulosten käsittelyosiosta.

Tulosteista koottiin excel-ohjelmalla ja NCSS-tilastonkäsittelyohjelmalla taulukoita, joissa tuloksista käsiteltiin erilaisia laskelmia. Tuloksista lisää tulokset kappaleessa.

Viiveaikaseuranta on suoritettu neljässä eri prosessinvaiheessa. Prosessinvaiheita ovat näytteenotto ja jäihin laitto, laboratorioon saapuminen, sentrifugoiminen ja analysaattoriin siirtyminen. Näytteenottoaikojen kirjauksesta vastasi opinnäytetyössäni Spiroergometria laktaattinäyttein -tutkimuksen hoitaja, joka kirjasi näytteenottoajat minuutin tarkkuudella ylös. Muista prosessinvaiheista kerätyistä ajoista olen vastannut itse. Jotta mahdollisimman tarkat ajat saataisiin selville, kulunseurannassa käytettiin kelloja, jotka oli asetettu minuutin tarkkuudella samaan aikaan. Näytteen saapuessa laboratorioon kirjattiin minuutintarkka aika aikaseuranta lomakkeelle. Tämän jälkeen näyte siirrettiin sentrifugiin joko välittömästi tai sentrifugin ollessa käytössä mahdollisimman nopeasti saapumisen jälkeen. Kun sentrifugi laitettiin päälle, kirjattiin

sentrifugiin siirtymisaika aikaseuranta lomakkeelle. Sentrifugoinnin jälkeen näyte kuljetettiin analysaattoripisteeseen, jossa näyte valmisteltiin analysointia varten. Kun näyte siirtyi analysaattoriin, kirjattiin aikaseurantalomakkeelle minuutintarkka aika ylös. Vastaavasti on toimittu jokaisen näytteen kanssa.

Ajanseurantalomakkeista koottiin excel-ohjelmalla taulukot potilaskohtaisista ajoista sekä näytekohtaisista keskiarvoajoista. Tulokset on esitetty tulokset osiossa.

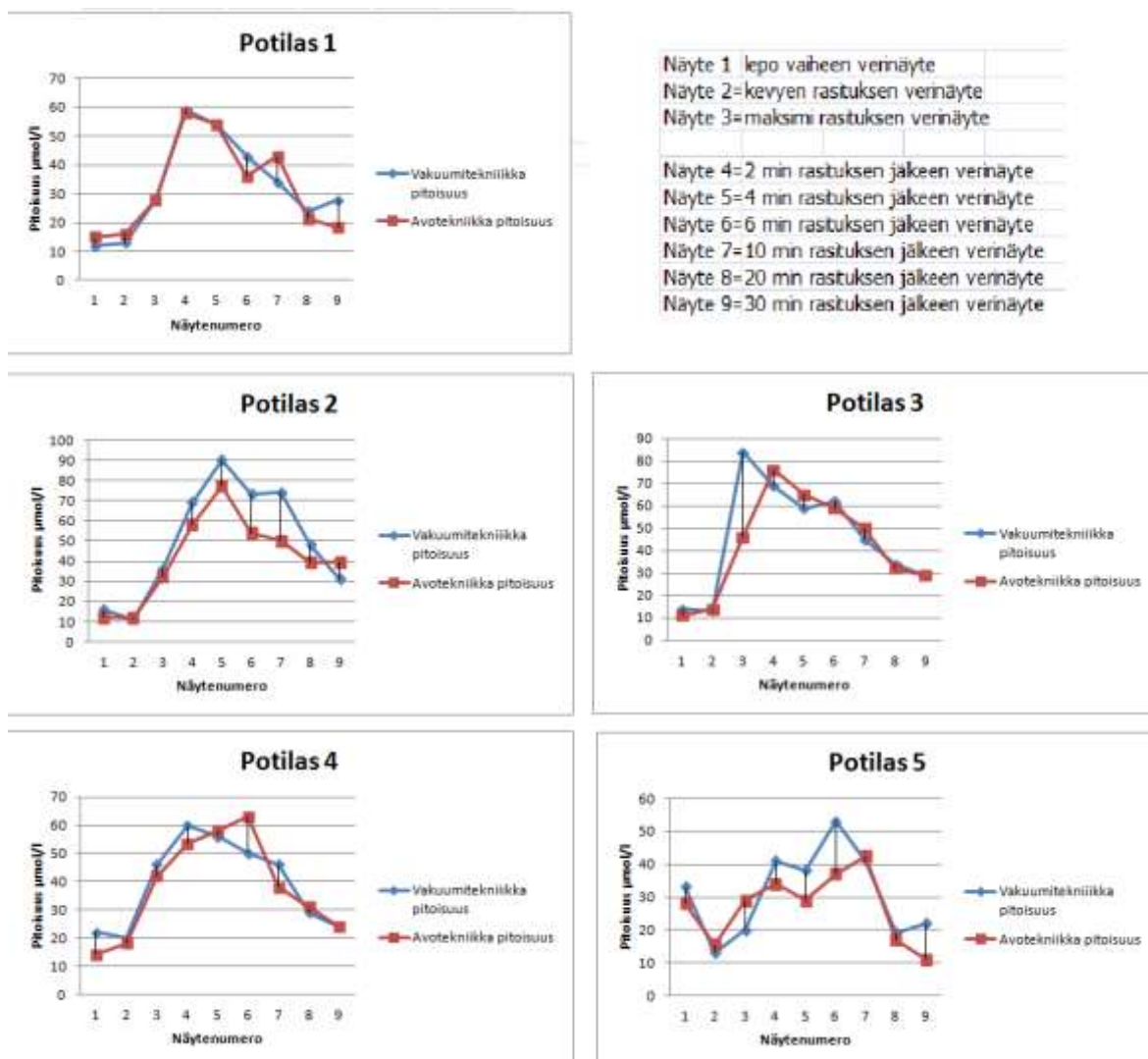
8 Tulokset

Tutkimustulokset on käsitelty täysin luottamuksellisesti. Tutkimusmateriaalina on toiminut potilaskohtaiset verinäytteet, jotka on numeroitu yhdestä yhdeksään. Tuloksista ei pystytä erottamaan tutkimushenkilön henkilötietoja tai yksittäisen henkilön tutkimustuloksia. Olen käsitellyt potilaskohtaisia materiaaleja anonyymisti nimeämällä tutkimuspotilaat juoksevin numeroin. Tuloksia olen käsitellyt excel-tilukko-ohjelmalla laskemalla keskiarvoja, keskihajontoja, t-testejä ja näytelepitoisuuksien erotuksia sekä NCSS-tilastonkäsittelyohjelmalla.

Tutkimuksen otanta oli kokonaisuudessaan seitsemän potilasta, joista kahden tutkimusmateriaalia ei otettu tutkimukseen mukaan. Potilaissa oli kummankin sukupuolen edustajia ja ikäjakauma oli vaihteleva. Tutkimuksessa ei ole otettu huomioon potilaiden ikää, sukupuolta tai fyysistä kuntoa. Tuloksissa tarkastellaan kahden tekniikan välisiä pitoisuuseroja, jolloin edellä mainituilla funktioilla ei ole vaikutusta tuloksiin.

8.1 Näytetekniikoiden vaikutus NH_4 -näytteen pitoisuuteen

Käsittelin tulokset excel-tilukossa potilaskohtaisina mittauksina. Liitteeseen 1 on koottu potilaskohtaisesti NH_4 -näytteiden tulokset molemmilla tekniikoilla sekä näyteleparien erotukset. Näytetekniikoiden erotuksien havainnollistamiseksi olen valmistanut potilaskohtaisesti kaaviot, joissa on esitetty näytteiden tulokset viivadiagrammeina. Tulokset on esitetty ja koottu kuvioon 3.



Kuvio 3. NH_4 -näytteiden tulokset kahdella eri näytteenottotekniikalla potilaskohtaisesti esitettynä.

Diagrammit havainnollistavat potilaiden näytepareista mitattuja NH_4 -Ion pitoisuuksia. Kuvioista voidaan havaita, että näytepitoisuuksissa on pientä heittelyä suhteessa näytteen numeroon. Potilas 2 kohdalla heittelyt näyttäisivät olevan hieman suurempia. Tätä havaintoa tukee myös tuloksista lasketut p-luvut. Kuvion 4 diagrammeista voidaan havaita, että potilas 2 näyteparien vertailussa on suurimmat erot avo- ja vakuumitekniikalla otetuissa näytteissä. Potilas 3 kohdalla hajontaa aiheuttaa näyte 3, jossa näyteparien ero on saatu $38 \mu\text{mol/l}$. Kun tarkastellaan kaikkien potilaiden tuloksia, voidaan havaita, että pitoisuuksien suurimmat erot sijoittuvat palautumisvaiheen näytteisiin 5 – 7. Palautumisvaiheessa NH_4 -ionin pitoisuus veressä saattaa vaihdella nopeasti, joka selittäisi myös erot avo- ja vakuumitekniikalla otettujen näytteiden eroissa (Piirilä 2011).

Potilas- ja näytekohtaisesta vaihtelusta, kokosin excel-tilukkkoon keskiarvot ja keskihajonnat näytteenottotekniikoiden erotuksista. Taulukossa 3 on esitettynä potilaskohtaiset arvot vaakasuunnassa ja näytekohtaiset arvot pystysuunnassa.

Taulukko 3. Näytetekniikoiden tulosten erotusten keskiarvot ja keskihajonnat potilas- ja näytekohtaisesti esitettyinä.

Potilas	Näyte1	Näyte2	Näyte3	Näyte4	Näyte5	Näyte6	Näyte7	Näyte8	Näyte9	keskiarvo	keskihajonta
1	-3	-3	0	1	0	7	-9,2	2,5	9,7	0,56	5,59
2	4	-0,5	4	11	13	19	24	9	-8,5	8,33	9,92
3	3	-1	38	-7	-6	3	-5	2	0	3,00	13,67
4	8	2	4	6,5	-2	-13	8	-2	0	1,28	6,64
5	5	-2,5	-9	7	9	16	-1,5	2	11	4,11	7,69
keskiarvo	3,40	-1,00	7,40	3,70	2,80	6,40	3,26	2,70	2,44		
keskihajonta	4,04	1,97	17,91	6,96	7,92	12,64	13,2	3,96	8,02		

Taulukkoon 3 on laskettu jokaisen näyteparin erotukset pitoisuuksissa ja esitetty keskiarvot ja keskihajonnat sekä näyte- että potilaskohtaisesti. Taulukkoa tarkastellessa voidaan huomata, että niin keskiarvoissa kuin keskihajonnoissakin tapahtuu melko suurta vaihtelua. Suuria arvojen vaihteluja aiheuttaa muunmuassa potilas 3 näyte 3 ja potilas 2 näyte 7. Pienin keskiarvo saadaan potilas 1 näytteissä ja suurin keskiarvo potilas 2 näytteissä. Näytekohtaisissa mittauksissa pienin keskiarvo on näytteen 2 kohdalla ja suurin keskiarvo näytteen 3 kohdalla. Keskihajonnoista voidaan huomata, että pienimmillään ne saavat arvon 1,97 ja suurimmillaan arvon 17,91. Keskihajonnan saadessa vaihtelevia arvoja, ei pelkkiin t-testin tuloksiin pystytä täysin luottamaan. Tästä syystä tarkasteltiin NCSS-ohjelmalla tekniikan ja ajanhetken yhdysvaikutusta tuloksiin.

Käytin parinvertailuasetelma menetelmää selvittäessäni tutkimuskysymystäni, kahden näytteenottotekniikan vaikutuksesta NH_4 -näytteen pitoisuuteen spiroergometria laktaattinäyttein -tutkimuksessa. Parinvertailu asetelman käyttö on perusteltu, koska tavoitteena on verrata kahta mittaria, joilla mitataan sama kohde samoissa olosuhteissa (Mellin 2010: 81). Tutkimuksessa käytettävät mittarit olivat avotekniikalla ja vakuumitekniikalla otetut NH_4 -verinäytteet. Tutkimustuloksille suoritettiin t-testi parinvertailuille potilaskohtaisesti. Siinä tutkittiin kahden mittarin erotuksen tilastollista merkitsevyysarvoa (p-luku). Testin nollahypoteesi on, että eri tekniikoiden välillä ei ole

tilastollisesti merkittävää eroa. Vastahypoteesi on, että tekniikoiden tulosten välillä on tilastollinen ero. Taulukossa 4 on esitetty potilaskohtaisesti t-testistä saatu p-luku.

Taulukko 4. Näytteenottotekniikoiden välisten erojen t-testin merkitsevyysarvo (p-luku) potilaskohtaisesti.

Tutkimuspotilas	p-luku
Potilas 1	0,773
Potilas 2	0,036
Potilas 3	0,129
Potilas 4	0,58
Potilas 5	0,148

P-luku kertoo todennäköisyyden, jolla mittaustulokset ovat peräisin nollahypoteesin mukaisista jakaumista. Mikäli p-luku saa arvon, joka on $<0,05$ testin nollahypoteesi hylätään ja vastahypoteesi astuu voimaan.

Tutkimukseni mukaan nollahypoteesi toteutuu neljässä tapauksessa viidestä. Potilaskohtaisten merkitsevyysarvojen perusteella tilastollisesti merkitsevää erotusta kahden näytteenottotekniikan välille ei synny lukuunottamatta potilas 2 ($p=0,036$) tuloksia. Tutkimukseni mukaan avotekniikalla otetun ja vakuumitekniikalla otetun NH_4 -näytteen välinen erotus ei ole tilastollisesti merkittävä suurimmassa osassa tapauksia.

Virhetekijöiden karsimiseksi tutkimusaineisto ajettiin NCSS-ohjelmalla erikoisopettaja J.-M. Kuusisen avustuksella. Koeasetelmana käytettiin kaksisuuntaista varianssianalyysia toistetuilla mittauksilla (Two-Way Repeated-Measures ANOVA). Testissä tutkittiin tekniikan ja ajanhetken yhteisvaikutusta sekä näytetekniikoiden välistä eroa.

Tutkimustulosten mukaan yhteisvaikutusta ei ole ($p= 0,962$). Tekniikan vaikutus näytepitoisuuteen tutkimuksen mukaan ei ole 5 % merkitsevyystasolla merkittävä ($p= 0,065$). Tutkimustulosten mukaan tekniikan ja ajanhetken yhteisvaikutus tai näytetekniikan valinta ei tilastollisesti ole merkittävä tutkimuksen kannalta.

Kun tarkastellaan kuvion 3 diagrammeja voidaan havaita, että isoimmat tuloserot syntyvät korkeilla NH_4 -ion-pitoisuustasolla. Kemisti Annukka Mäen avustuksella tulokset jaettiin kolmeen pitoisuusalueeseen: alle 30 $\mu\text{mol/l}$, 30–50 $\mu\text{mol/l}$ ja yli 50 $\mu\text{mol/l}$. Pitoisuusalueista tarkasteltiin tulosparien keskimääräistä eroa prosenttuaalisesti. Erotukset on laskettu seuraavalla kaavalla: $(\text{avo-vakuumi})/\text{vakuumi} \cdot 100$. Tulokset on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. NH_4 -näytteiden pitoisuusalueiden tulosparien keskimääräiset erot (Mukaillen Mäki 2012).

Pitoisuusalue	Keskimääräinen ero %	Lukumäärä = n
alle 30 $\mu\text{mol/l}$	-3,7	18
30-50 $\mu\text{mol/l}$	-2,8	14
yli 50 $\mu\text{mol/l}$	-12,1	13

Ammonium-testimenetelmää validoitaessa testin kokonaisvariaatioksi pitoisuustasolla 35 $\mu\text{mol/l}$ saatiin 8,5 %. Yksittäisissä tuloksissa analyttinen luottamusväli on +/- 8,5 %. Tällöin pitoisuus ero 35 $\mu\text{mol/l}$ pitoisuuksista ylöspäin näyteparien prosentuaalinen ero saisi olla korkeintaan 17 %, mikäli näytteiden välillä ei ole eroa. Määritelmä toteutuu alle 30 $\mu\text{mol/l}$ ja 30–50 $\mu\text{mol/l}$ pitoisuusalueilla, mutta ei yli 50 $\mu\text{mol/l}$. (Mäki 2012.)

8.2 Viiveaikaseuranta

Olen koostanut viiveaikaseurannasta potilaskohtaiset taulukot. Viiveaikaseurannasta on koostettu myös taulukko, jossa on esitetty keskiarvot näytenumerokohtaisesti. Taulukoissa on esitetty näytepareittain viiveajat jokaisen prosessivaiheen välillä (esimerkiksi näytteenoton ja näytteen saapumisen välinen aika) sekä viimeisenä koko prosessiin kulunut aika minuutteina (näytteenoton ja analysointiin siirtymisen välinen aika). Taulukoissa olevat ajat ovat esitetty minuutteina. Taulukossa 6 on esitetty viiveaikojen keskiarvot näytekohtaisesti kokonaisminuutteina. Potilaiden aikaseurannat löytyvät liitteestä 2.

Taulukko 5. Spiroergometria laktaattinäyttein -tutkimuksen NH₄-näytteiden prosessinkulun viiveaikaseuranta, keskiarvoiset viiveajat näytekohtaisesti kokonaisminuutteina.

	näytteenotto/saapuminen	saapuminen/sentrifugi	sentrifugi/analysointiaika	näytteenotto/analysointiaika
1	5	2	15	22
2	4	6	22	32
3	6	4	22	32
4	8	4	19	31
5	7	4	19	30
6	7	9	17	33
7	5 (avo 7)	8 (avo 8)	16 (avo 16)	29 (avo 31)
8	6	12	15	33
9	5	3	15	23

Näytteenumeron keskiarvoja tarkastellessa näyttäisi siltä, että analysointiprosessin kesto on keskimääräisesti hieman lyhyempi näytteiden 1 ja 9 kohdalla. Muutoin kokonaisajat ovat suurinpiirtein samaa luokkaa. Suurimmat viiveaikojen heittelyt näytekohtaisissa keskiarvoissa näyttävät tulevan laboratorioon saapumisen ja sentrifugoinnin välille. Näissä ajoissa joillain näytteillä seisotusaika on 2 minuuttia kun taas joillain näytteillä se lähenee jo 10 minuuttia. Näytteidenoton ja saapumisenkin välille vaikuttaisi tulevan keskimääräisiä eroja riippuen näytteenumerosta. Tämä saattaisi johtua siitä, että esimerkiksi näytteet 4, 5 ja 6 otetaan 2 minuutin välein, jolloin tutkimushoitaja ei pysty tuomaan jokaista näytettä erikseen, vaan kyseiset näytteet saapuvat laboratorioon yleensä samalla kertaa yhdessä. Potilas 7 näyteparin viiveajoista syntyy hieman heittelyä, joka johtuu avotekniikalla otetun NH₄-näytteen saapumisesta laboratorioon 2 minuuttia myöhemmin kuin vakuumitekniikalla otettu verinäyte. Keskimääräisissä ajoissa voidaan havaita myös, että sentrifugoinnin ja analyysivaiheen välillä tapahtuu muutaman minuutin heittelyjä riippuen näytteenumerosta.

Potilaskohtaisista viiveaikatuloksista selviää, että kaikki näytteet pääsivät analyysivaiheeseen alle 60 minuutissa näytteenotosta. Näytteiden välisissä kokonaisviiveajoissa oli hieman heittelyä 19 minuutista 42 minuuttiin (Liite 2). Näyttäisi siltä, että viiveajan pituus riippuu näytteenumerosta ja joissain tutkimuksissa mahdollisesti vuorokauden ajasta. Viiveajat vaikuttavat olevan pidempiä näytteiden 3–7 kohdalla, joka todennäköisesti johtuu näytteiden toimituksesta analyysilaboratorioon. Suurimmat viiveajat näyttäisivät syntyvän sentrifugin ja analyysivaiheen välille. Mutta kuten keskiarvoista huomataan, keskiarvoajat heittelevät vain hieman. Viiveaikoja tulkitessa tulee ottaa huomioon, että sentrifugointiaika on 10 minuuttia, jota ei voida laskea

varsinaiseksi viiveajaksi. Tällöin viiveaika sentrifugoinnin ja analyysivaiheen välillä ei vaikuttaisi olevan kovinkaan pitkä.

9 Pohdinta

Tutkimukseni päätarkoituksena oli selvittää, onko vakuuminäytetekniikalla ja avonäytetekniikalla otetuissa ammonium-ioni-pitoisuutta mittaavissa verinäytteissä tilastollisesti merkittävää pitoisuuseroa, kun näytteet on otettu spiroergometria laktaattinäyttein -tutkimuksessa peräkkäisinä näytteinä. Tutkimustulosteni mukaan näytteenottotekniikan valinnalla ei ole t-testien mukaan tilastollisesti merkittävää vaikutusta näytepitoisuuteen. Tutkimusongelmani ratkaisin mittaamalla Cobas Integra 400 analysaattorilla, kahdella eri näytteenottotekniikalla otettujen NH_4 -näytteiden pitoisuuseroja parivertailuna viiden potilaan spiroergometria laktaattinäyttein - tutkimuksen näytteistä. Vastaavanlaista tutkimusta ei ole aikaisemmin suoritettu, joten vertailua muihin tutkimuksiin ei ole voitu tehdä.

Tutkimukseni mukaan avo- ja vakuumitekniikalla otettujen NH_4 -näytteiden näytepitoisuuksien erotus ei ole tilastollisesti merkittävä parinvertailujärjestelmällä suoritettuna t-testin mukaan. Neljässä tapauksessa viidestä tutkimus antaa merkitsevyysarvoksi yli 0,05. Näyttäisi siltä, että tekniikan valinnalla ei ole väliä, sillä nollassa hypoteesi hylättiin vain yhden testin kohdalla. Tutkimukselle asetettu hypoteesi, jonka mukaan näytetekniikoiden vaikutus näytepitoisuuteen ei ole tilastollisesti merkittävä, sai tukea tutkimukseni tuloksista. Tutkimukseni tulokset antavat avotekniikan käytölle kliiniset perusteet mikäli standarditekniikalla ei saada toteutettua näytteenottoa.

T-testi on suoritettu työssäni vain potilaskohtaisesti, jolloin otos on ollut yhdeksän ($n=9$) näyteparia. Väärien riippumattomuussuhteiden vuoksi, t-testiä ei voitu suorittaa kaikille näytepareille yhtäaikaisesti. Syynä tähän on se, että jokaisen potilaan näytteissä on vahva korrelaatio. Jos kaikkien potilaiden näytteet yhdistettäisiin, näytteiden riippuvuus suhteet olisivat vääriä. Tällöin t-testin yleiset hypoteesit eivät pidä paikkaansa riippumattomuuden suhteen, jolloin t-testi antaa mahdollisesti virheellisiä

tuloksia. Mikäli näin oltaisiin tehty, tuloksiin olisi syntynyt vääränlaisia muuttujasuhteita ja tulosten perusteella oltaisiin tehty vääriä johtopäätöksiä. Tästä syystä aineistolle suoritettiin NCSS-tilastonkäsittelyohjelmalla kaksisuuntainen varianssianalyysi toistetuilla mittauksilla, joka tukee potilaskohtaisten t-testien tulosten luotettavuutta. NCSS-ohjelmalla aineisto pystyttiin jakamaan erillisiin lohkoihin potilaiden, näytenumeroiden ja eri tekniikoiden suhteen. Tällöin pystyttiin paremmin erottamaan mahdolliset virhelähteet. Koska tarkoituksena oli tutkia näytetekniikoiden välistä eroa, virheiden syyt ja seuraukset pyrittiin tällä tavoin sulkemaan pois. Tutkimuksen avulla saatiin määriteltä pois satunnaista virhettä aiheuttavat tekijät, jolloin päästiin käsiksi pelkästään näytteenottotekniikan vaikutuksiin.

Tulosten arvioinnissa on kuitenkin syytä ottaa huomioon myös sallittu ero klinisen tulkinnan kannalta. Pitoisuusalueille jaetuista tuloksista voitiin huomata, että sallittu ero prosentuaalisesti toteutui vain 30 $\mu\text{mol/l}$ ja 30-50 $\mu\text{mol/l}$ tasoilla. Asian suhteen olisi hyvä suorittaa lisätutkimuksia, miksi vaihtelu on suurempaa korkeissa NH_4 -ion-tasoissa.

Opinnäytetyöni aineiston koko määräytyi tutkimuspotilaiden soveltuvuudesta kyseiseen tutkimukseen. Spiroergometria laktaattinäyttein -tutkimus on melko harvinainen ja näitä tutkimuksia suoritetaan verrattain harvoin. Lisäksi tutkimus on melko haasteellinen sekä potilaalle että tutkimuksen tekijälle, josta syystä opinnäytetyön tutkimukseen pyrittiin valitsemaan terveitä, hyvä suonisista potilaita. Opinnäytetyön vaatimukset asettivat potilaiden valitsemiselle tiukat rajat, josta syystä otanta jäi seitsemään potilaaseen. Ammonium-ioni tutkimuksen analyysivaihe on melko herkkä, josta syystä näyte ei saa olla esimerkiksi lipeeminen. Edellä mainitusta syystä jouduin hylkäämään yhden potilaan näytteet tutkimuksestani, koska niitä ei voitu analysoida. Opinnäytetutkimukseni kannalta myös näyteparien sama näytteenkäsittelyprosessi oli tärkeä suorittaa täysin samalla tavalla. Näytteiden tuli kulkea pareittain koko prosessin läpi, jotta tulokset olisivat parivertailussa luotettavat. Tutkimukseni aikana jouduin hylkäämään erään potilaan näytteet, sillä näyteparit erkanivat toisistaan väärinkäsitysten seurauksena. Tutkimusmateriaali kokonaisuudessaan oli kuitenkin riittävä tutkimusongelman ratkaisemiseen. Tutkimuksen luotettavuutta olisi kuitenkin parantanut suurempi näyteparien määrä.

Pohdin tutkimukseni aikana, onko sentrifugin ohjelman valinnalla suuri vaikutus näytteen pitoisuusvaihteluun. Menetelmäohjeen mukaan ammonium-ioni näyte tulee sentrifugoida kylmäfuugissa mahdollisimman nopeasti näytteenoton jälkeen. Sentrifugin viilentäminen vie kuitenkin vähintään 20 minuuttia, jolloin näytteen seisottaminen saattaisi aiheuttaa pitoisuuteen muutoksia. Tärkeämpää näytteen kannalta on nopea sentrifugoiminen kuin sentrifugin viilentäminen. Näytteen pitoisuuteen vaikuttaa kuitenkin niin moni tekijä, ettei yksittäisten sentrifugiohjelmien vaikutusta pystytä arvioimaan tarkasti.

Tutkimuksen tulokset herättävät kysymyksen, voiko ajanhetken valinta vaikuttaa eri näytetekniikoilla otettujen näytteiden pitoisuuseroihin. NCSS-ohjelmalla suoritettua ”kaksisuuntainen varianssianalyysi toistetuilla mittauksilla” avulla poissuljettiin tekniikan ja ajanhetken muuttujien yhdysvaikutus. Tulosten mukaan ajanhetkellä ei ole vaikutusta pitoisuuseroihin ($p=0,962$). Tämä näyttäisi osoittavan, että näytemateriaalille suoritettua potilaskohtaisia t-testejä, ovat luotettava tapa tutkia näytetekniikoiden eroa.

Opinnäytetyössäni nollahypoteesina oli, että näytetekniikan vaikutus pitoisuuteen ei ole tilastollisesti merkittävä. Jotta tämä toteutuisi parhaalla mahdollisella tavalla, kumpikin näyte olisi tullut ottaa samanaikaisesti. Tuloksiin on saattanut aiheutua pientä heittelyä tekniikoiden välillä, sillä teknisistä syistä näytteitä ei ole kyetty ottamaan täysin samaan aikaan. Näytteenottojärjestys on jokaisessa tutkimuksessa ollut aina sama, avonäyte ensimmäisenä, vakuuminäyte pienellä viiveellä. Viive aiheutui holkin kiinnittämisestä näytteenottokanyyliin. Tilastollisesti ajatellen näytteenottotekniikka olisi pitänyt arpoa, jokaisen näytteenotto kerran yhteydessä, jotta tulokset olisivat mahdollisimman luotettavat. Tätä ei kuitenkaan ole pystytty suorittamaan spiroergometria laktaattinäytteiden tutkimuksen luonteen vuoksi. Tulosten arvioimisessa kyseinen seikka on huomioitu ja mahdollista vaikutusta tuloksiin on pohdittu.

Viiveaikatutkimuksen tulokset osoittavat, että NH_4 -näytteiden analyysi tapahtuu määrääjässä eli alle 60 minuutissa näytteenotosta. Viiveajoissa on niin potilaskohtaisia kuin näytekohtaisiakin eroja. Esimerkkinä voisi käyttää potilas 1 ja potilas 2 näytteiden saapumisen ja sentrifugoinnin välisiä aikoja. Potilas 1 kohdalla näytteet on saatu nopeasti saapumisensa jälkeen sentrifugiin, mutta potilas 2 kohdalla seisotus ja

odotusajat saattoivat olla jopa 10 minuuttia. Onko mahdollista, että tällaiset erot vaikuttaisivat analysoitavaan pitoisuuteen? Opinnäytetyöni kannalta tällä kysymyksellä ei kuitenkaan ole niin suurta merkitystä, sillä viiveajat ovat kuitenkin olleet samat avo- ja vakuuminäytteen kohdalla, kun näytteet ovat kulkeneet prosessin läpi pareina. Keskimääräisissä näytekohtaisissa mittauksissa erot ovat melko tasaisia. Tästä voisi päätellä, ettei potilaskohtaiset erot näytenumeron viiveajoissa lopulta vaikuttaisi niin suuresti analyysiprosessin kestoon. Keskiarvoiset näytekohtaiset kokonaisaika tulokset osoittavat, että analyysiprosessin ajat ovat lähellä 30 minuuttia jokaisen näytteen kohdalla. Tästä voisi päätellä, että heittelyä syntyy näyte- ja potilaskohtaisesti jokaisen tutkimusvaiheen kohdalla, mutta lopputulos on aina lähelle 30 minuuttia.

Viiveaikoihin on saattanut vaikuttaa myös kellonaika, jolloin tutkimus on aloitettu. Esimerkiksi, jos potilaan tutkimus alkaa klinisen fysiologian laboratoriossa kello 10.00, ensimmäiset näytteet saapuvat klinisen kemian laboratorioon kello 11 jälkeen. Lounastuntien aikaan laboratorioissa saattaa olla henkilökunta vajetta analysaattoreilla. Luonnollisista syistä työntekijät eivät pysty venymään joka paikkaan, joten viiveaikoja saattaa syntyä. Myöskin tutkimushoitajien määrä on rajallinen, josta syystä lyhyissä näytteenottoväleissä ei pystytä toimittamaan näytteitä analyysi laboratorioon välittömästi näytteenoton jälkeen.

Mikäli avonäytteenottotekniikkaa halutaan käyttää spiroergometria laktaattinäyttein - tutkimuksessa tulisi ottaa huomioon näytteenotosta syntyvät tekniset ongelmat. Avonäytteenottotekniikka saattaa osoittautua haasteelliseksi erityisesti rasitusvaiheen näytteenotoissa, kun potilas polkee pyöräergometrilla. Näyte määrä tulee olla myös avonäytteessä vakioitu, jolloin oikean näytemäärän arvioiminen on näytteenottajan vastuulla. Tämä seikka voi osoittautua haasteelliseksi näytteenottoaikojen vuoksi. Myös kanyylista otettava avonäytteenotto voi osoittautua hankalaksi, jos kanyylinäytteenotto ei muutoin ole tuttu näytteenottajalle.

Opinnäytetyön jatkotutkimuksena voitaisiin suorittaa tutkimus suuremmalla potilas- ja näytemäärällä. Jatkotutkimuksia varten voitaisiin tehdä tarkka tutkimussuunnitelma näytteenotosta, kulku prosessista ja analysoimisesta. Työ vaatisi useamman työntekijän, mutta antaisi klinisesti luotettavampia tuloksia. Toisena jatkotutkimuksena voitaisiin tutkia, miten erimittaiset seisotusajat vaikuttavat NH_4 -näytteen pitoisuuteen.

Menetelmäohjeen mukaan ammonium-ioni näyte tulee tutkia tunnin sisällä näytteenotosta. Seisotusajoissa on kuitenkin hieman vaihtelua johtuen esimerkiksi analyysilaboratorion näytteiden käsittelypisteen kiire tilanteesta ja sentrifugien lukumäärästä. Tutkimuksella voitaisiin kartoittaa, kuinka paljon seisotusaika vaikuttaa pitoisuuteen, jolloin saataisiin kliinisesti merkittävää tietoa potilaan hyväksi. Kuten aikaisemmin jo pohdinta kappaleessa on mainittu, myös pitoisuuserojen vaihtelujen merkittävyyttä korkeissa tasoissa olisi syytä tutkia tarkemmin.

Lähteet

Cobas INTEGRA 400/700/800 2000. Ammonia. Laiteohje 10/2000 Versio 1.0. Roche.

Haapalahti, P 2009. Spiroergometria. Menetelmäohje. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Kliininen fysiologia ja isotooppilääketiede.

Koolman, J – Roehm, K. H 2005. Color Atlas of Biochemistry. New York: Thieme. 30.

Kuusinen, J.-M. 2012. Erikoisopettaja. Systeemianalyysin laboratorio, Aalto-yliopiston perustieteiden korkeakoulu. Henkilökohtainen keskustelu. 21.3.

Mellin, Ilkka 2010. Tilastolliset menetelmät: Kaavat. Teoksessa Mellin, Ilkka: Todennäköisyyslaskenta ja tilastotiede: Kaavat. Omakustanne. 81–85.

Mäki, Annukka 2012. Kemisti. Meilahden kliininen kemia ja hematologia. Helsinki. Konsultaatio. 26.5.

Penttilä, Ilkka 1998. Maksa. Teoksessa Vilpo, Juhani (toim.): Laboratoriolääketiede, Kliininen kemia ja hematologia. Jyväskylä: Kandidaattikustannus Oy. 169.

Piirilä, Päivi 2011. Ylilääkäri. HUS, kliinisen fysiologian ja isotooppilääketieteen laboratorio. Helsinki. Suullinen tiedonanto 13.09.

Sovijärvi, Anssi 2003a. Kliininen rasisuskoe. Teoksessa Sovijärvi, Anssi – Ahonen, Aapo – Hartiala, Jaakko – Länsimies, Esko – Savolainen, Sauli – Turjanmaa, Väinö – Vanninen, Esko (toim.): Kliininen fysiologia ja isotooppilääketiede. Hämeenlinna: Duodecim. 332– 334, 339.

Sovijärvi, Anssi 2003b. Spiroergometria. Teoksessa Sovijärvi, Anssi – Ahonen, Aapo – Hartiala, Jaakko – Länsimies, Esko – Savolainen, Sauli – Turjanmaa, Väinö – Vanninen, Esko (toim.): Kliininen fysiologia ja isotooppilääketiede. Hämeenlinna: Duodecim. 245–246.

Tuokko, Seija – Rautajoki, Anja – Lehto, Liisa 2008. Kliiniset laboratorionäytteet – opas näytteiden ottoa varten. Gummerus Kirjapaino Oy: Tammi. 46–50.

Uotila, Lasse 2009. Tutkimusohjekirja. Ammonium-ioni, plasmasta, paastotilassa. HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri. Verkkodokumentti. <<http://huslab.fi/ohjekirja/1071.html>. Luettu 12.3.2012>

Potilaskohtaiset NH₄-tulokset

Vakuumitekniikka = vakuumitekniikalla otettu NH₄-verinäyte

Avotekniikka = avotekniikalla otettu NH₄-verinäyte

Näyte 1 = lepo vaiheen verinäyte

Näyte 7 = 10 min rasituksen jälkeen verinäyte

Näyte 2 = kevyen rasituksen verinäyte

Näyte 8 = 20 min rasituksen jälkeen verinäyte

Näyte 3 = maksimi rasituksen verinäyte

Näyte 9 = 30 min rasituksen jälkeen verinäyte

Näyte 4 = 2 min rasituksen jälkeen verinäyte

Näyte 5 = 4 min rasituksen jälkeen verinäyte

Näyte 6 = 6 min rasituksen jälkeen verinäyte

Potilas 1

	Vakuumitekniikka		Avotekniikka		Erotus
	pitoisuus		pitoisuus		
Näyte 1	12		15		-3
Näyte 2	13		16		-3
Näyte 3	28		28		0
Näyte 4	59		58		1
Näyte 5	54		54		0
Näyte 6	43		36		7
Näyte 7	34		43,2		-9,2
Näyte 8	24		21,5		2,5
Näyte 9	28		18,3		9,7

Potilas 2

	Vakuumitekniikka		Avotekniikka		Erotus
	pitoisuus		pitoisuus		
Näyte 1	16		12		4
Näyte 2	11		11,5		-0,5
Näyte 3	36		32		4
Näyte 4	69		58		11
Näyte 5	90		77		13
Näyte 6	73		54		19
Näyte 7	74		50		24
Näyte 8	48		39		9
Näyte 9	31		39,5		-8,5

Potilas 3

	Vakuumitekniikka		Avotekniikka		Erotus
	pitoisuus		pitoisuus		
Näyte 1	14		11		3
Näyte 2	13		14		-1
Näyte 3	84		46		38
Näyte 4	69		76		-7
Näyte 5	59		65		-6
Näyte 6	62		59		3
Näyte 7	45		50		-5
Näyte 8	34		32		2
Näyte 9	29		29		0

Potilas 4

	Vakuumitekniikka		Avotekniikka		Erotus
	pitoisuus		pitoisuus		
Näyte 1	22		14		8
Näyte 2	20		18		2
Näyte 3	46		42		4
Näyte 4	60		53,5		6,5
Näyte 5	56		58		-2
Näyte 6	50		63		-13
Näyte 7	46		38		8
Näyte 8	29		31		-2
Näyte 9	24		24		0

Potilas 5

	Vakuumitekniikka		Avotekniikka		Erotus
	pitoisuus		pitoisuus		
Näyte 1	33		28		5
Näyte 2	13		15,5		-2,5
Näyte 3	20		29		-9
Näyte 4	41		34		7
Näyte 5	38		29		9
Näyte 6	53		37		16
Näyte 7	41		42,5		-1,5
Näyte 8	19		17		2
Näyte 9	22		11		11

Nh₄-ioni näytteiden laboratorioanalyysiprosessin aikaseuranta

Aikaseuranta on esitetty minuutin tarkkuudella potilaskohtaisesti jokaisen näyteparin seurantaan. Mittaus pisteitä ovat olleet näytteenottohetki, näytteen saapuminen analyysilaboratorioon, näytteen sentrifugointi ja näytteen siirtyminen analysaattoriin. Taulukossa on seurattu näiden mittauspisteiden välisiä aikoja ja lopuksi koottu kokonaisaika koko prosessista näytteenotosta analysaattoriin siirtymiseen asti.

Potilas 1	näytteenotto/saapuminen	saapuminen/sentrifugi	sentrifugi/analysaattori	näytteenotto/analysaattori
1	6	1	12	19
2	6	2	26	34
3	5	4	16	25
4	16	4	14	34
5	14	4	14	32
6	12	4	14	30
7	8	4	14	26
8	11	2	19	32
9	2	2	19	23

Potilas 2	näytteenotto/saapuminen	saapuminen/sentrifugi	sentrifugi/analysaattori	näytteenotto/analysaattori
1	4	3	12	19
2	2	7	33	42
3	3	8	23	34
4	10	10	17	37
5	8	10	17	35
6	6	10	17	33
7	7	6	17	30
8	2	14	13	29
9	6	1	13	20

Potilas 3	näytteenotto/saapuminen	saapuminen/sentrifugi	sentrifugi/analysaattori	näytteenotto/analysaattori
1	5	1	19	25
2	5	3	14	22
3	9	2	20	31
4	5	2	20	27
5	3	2	20	25
6	8	15	15	38
7	4	15	15	34
8	4	18	12	34
9	8	5	12	25

Potilas 4	näytteenotto/saapuminen	saapuminen/sentrifugi	sentrifugi/analysaattori	näytteenotto/analysaattori
1	5	1	14	20
2	3	2	18	23
3	2	1	31	34
4	7	1	22	30
5	5	1	22	28
6	3	1	22	26
7	1 (avo 14)	7 (avo 7)	20 (avo 16)	28 (avo 37)
8	7	7	16	30
9	2	1	16	19

Potilas 5	näytteenotto/saapuminen	saapuminen/sentrifugi	sentrifugi/analysaattori	näytteenotto/analysaattori
1	6	4	19	29
2	4	14	20	38
3	9	3	20	32
4	6	3	20	29
5	4	3	20	27
6	4	13	16	33
7	4	10	16	30
8	4	18	16	38
9	5	7	16	28